

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



⑬ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

⑫ **Off nlegungsschrift**  
⑩ **DE 44 27 531 A 1**

⑤ Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**C 07 K 7/00**  
A 61 K 38/22  
A 61 K 49/00

⑲ Aktenz ich n: P 44 27 531.5  
⑳ Anmeldetag: 4. 8. 94  
㉑ Offenlegungstag: 8. 2. 96

**DE 44 27 531 A 1**

⑦ Anmelder:  
Forssmann, Wolf-Georg, Prof. Dr.med., 30175  
Hannover, DE

⑦ Erfinder:  
Bensch, Klaus W., Dr.rer.nat., 30625 Hannover, DE;  
Forssmann, Wolf-Georg, Prof. Dr.med., 30625  
Hannover, DE; Schulz-Knappe, Peter, Dr.med., 30625  
Hannover, DE

⑤4 Humanes zirkulierendes  $\beta$ -Defensin hBD-1

⑤7 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Polypeptid mit antibiotischen Eigenschaften, humanes  $\beta$ -Defensin 1 (kurz hBD-1) sowie von ihm abgeleitete Fragmente und/oder Derivate, ein für hBD-1 oder von ihm abgeleiteten Fragmente kodierendes Polynukleotid, insbesondere eine cDNA, ein Arzneimittel enthaltend das erfindungsgemäße Peptid, ein Diagnosemittel, Verwendung von hBD-1 für zweite medizinische Indikationen sowie eine Nukleinsäuresonde hybridisierend für das  $\beta$ -Defensin hBD-1 oder eines seiner Fragmente.

**DE 44 27 531 A 1**

## Beschreibung

Das  $\beta$ -Defensin hBD-1 konnte überraschend rasch aus humanem Hämofiltrat isoliert werden. Es besteht aus der nachstehend angegebenen Aminosäuresequenz:

DHYNCVSSGG QCLYSACPIF TKIQGTCYRG KAKCKK

Das erfindungsgemäße Peptid ist erhältlich durch ein Reinigungsverfahren ausgehend von humanem Hämofiltrat.

Das humane Hämofiltrat wird gegebenenfalls mit Wasser verdünnt und angesäuert. Der pH-Wert beträgt vorzugsweise 1,5 bis 3,5, insbesondere 2,5 bis 3,0. Danach wird das Hämofiltrat über einen Kationenaustauscher geleitet, beispielsweise einem mit Sulfonsäuregruppen modifizierenden Trägermaterial (Fraktogel SP-650 (M), Merck, Darmstadt). Die an den Kationenaustauscher gebundenen Peptide werden mit einer relativ hochkonzentrierten Salzlösung eluiert. Die Ionenstärke der Elutionslösung entspricht dabei ungefähr einer 0,7 bis 1,3 molaren Natriumchloridlösung.

Das aufgefangene Eluat wird mit einem peptidfallenden Reagenz, beispielsweise Ammoniumsulfat, versetzt. Die Ausfällung der Peptide erfolgt vorzugsweise bei niedrigeren Temperaturen, insbesondere im Bereich von 4°C bis 10°C. Das so gewonnene Präzipitat wird von der überstehenden Lösung abgetrennt.

Das Präzipitat wird in Wasser gelöst und die Lösung neutralisiert, vorzugsweise mit Natriumhydroxid auf einen pH zwischen 6,5 und 7,0. Die hochmolekularen Proteine werden von den Peptiden abgetrennt, beispielsweise mit Hilfe einer Ultrafiltration durch eine Ultrafiltrationsmembran mit einer Ausschlussgrenze von 20 000 Da (Cellulosetriacetat-Membran der Fa. Sartorius).

Das die Peptide enthaltene Ultrafiltrat wird einer weiteren Kationenaustausch-Chromatographie unterzogen. Diese Chromatographie ist vorzugsweise eine Gradientenelutions-Chromatographie mit einem Puffer geringerer Ionenstärke bis zu einem Puffer mit höherer Ionenstärke entsprechend einer Ionenstärke von 0,7 M bis 1,3 M Ammoniumacetat.

Die das erfindungsgemäße Peptid enthaltenen Fraktionen werden mittels semipräparativer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C4 modifizierten Trägermaterialien weitergereinigt. Der Aufreinigungsgrad wird vorzugsweise mittels analytischer Umkehrphasen-Chromatographie beispielsweise an mit C18 modifizierten Trägermaterialien und der Kapillarzonenelektrophorese überprüft.

Die durch die chromatographische Reinigung erhaltene Substanz wurde der Strukturaufklärung zugeführt. Die Bestimmung der Molekülmassen des nativen Peptids sowie seiner proteolytischen Fragmente und chemisch modifizierten Derivate erfolgte mittels eines Sciex API III Massenspektrometers. Die Aminosäureanalyse wurde nach einer sauren Totalhydrolyse durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte über einen Edman-Abbau der Peptide, seiner proteolytischen Spaltprodukte sowie von chemisch modifizierten Derivaten mit einem ABI 473 A Sequenzer.

Aus der erfindungsgemäßen Peptidsequenz läßt sich ein Polynukleotid ableiten, kodierend für das  $\beta$ -Defensin hBD-1.

Das Polynukleotid ist insbesondere eine cDNA, die sowohl als Ausgangspunkt einer gentechnischen Herstellung des  $\beta$ -Defensins hBD-1 dienen kann, wie auch als analytisches Werkzeug zu Nachweis des Auftretens von für das Peptid kodierender DNA oder mRNA.

Dabei können entsprechende Derivate als Hybridisierungssonden eingesetzt werden. Beispielsweise weist die cDNA des erfindungsgemäßen Peptids die nachstehende Sequenz auf:

```
GAC CAC TAT AAC TGC GTC AGC AGT GGA GGG
CAA TGT CTC TAT TCT GCC TGC CCG ATC TTT
ACC AAA ATT CAA GGC ACC TGT TAC AGA GGG
AAG GCC AAG TGC TGC AAG
```

Neben der gentechnischen Herstellung ist auch die aufbauende Totalsynthese an üblichen Festphasen im Sinne der Merrifield-Synthese möglich. Die Synthesestrategie und der Aufbau des Peptids und von ihm abgeleiteten Derivaten mit den entsprechend geschützten Aminosäuren sind dem Fachmann bekannt.

Das erfindungsgemäße Peptid kann als Arzneimittel Verwendung finden. Seine biologische Aktivität entspricht der einer antibiotischen Substanz. Es ist daher geeignet, als Arzneimittel bei den in Anspruch 10 bis 12 genannten Indikationen eingesetzt zu werden. Das erfindungsgemäße Peptid kann dabei in für Peptide üblicher Weise parenteral, intravenös, intramuskulär, intranasal, lokal-topisch oder bukal verabreicht werden. Die Menge an zu verabreichenden Peptid beträgt 1 mg bis 1 g pro Darreichungseinheit pro Tag.

Das erfindungsgemäße Diagnostikum enthält poly- oder monoklonale Antikörper gegen das erfindungsgemäße Peptid gegebenenfalls in fluoreszenz- oder radioaktivmarkierter Form, um in an sich bekannten ELISA oder RIA eingesetzt zu werden.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben.

## Beispiel 1

## Batch-Extraktion

In sechs Ansätzen wurden je 800 l humanes Hämofiltrat mit Wasser auf 2500 l verdünnt und der pH mit konzentrierter HCl auf 2,7 eingestellt. Nach Auftrag auf eine Amicon-Vantage Säule wurden die gebundenen Peptide in 6 bis 7 l eluiert (Chromatogramm siehe Abb. 1).

#### Chromatographiebedingungen:

Säule: Amicon-Vantage (25 cm Durchmesser × 7 cm Füllhöhe) 5  
 Füllmaterial: Merck Fractogel SP-650 (M)  
 Batchpuffer: 1 M NaCl, pH 5,5  
 Fluß beim Auftrag: 2 l/min  
 Fluß beim Eluieren: 1 l/min  
 Detektion: 214 nm 10  
 Anlage: Pilot-Scale Eigenbau

#### Ammoniumsulfat-Fällung

Das Eluat wurde direkt nach der Elution mit 660 g/l Ammoniumsulfat versetzt und die Peptide über Nacht bei 4°C ausgefällt. Das Peptidpräzipitat wurde über einen Büchner-Filter filtriert. 15

#### Ultrafiltration

Das in 2 l Wasser gelöste Peptidpräzipitat aus 4800 l Hämofiltrat wird mit Natronlauge auf pH 6,8 eingestellt. Eine Abtrennung hochmolekularer Proteine erfolgt über eine Ultrafiltration an einer Zelluloseetriacetat-Membran mit einer Ausschlußgröße von 20 kDa (Sartorius Sartocoon Mini). 20

#### Kationenaustausch-Chromatographie

Das Filtrat nach Ultrafiltration wird auf eine Leitfähigkeit von 5,7 mS/cm mit Wasser verdünnt und ein pH von 3,0 mit HCl eingestellt. Die Peptidlösung wird auf eine Amicon-Vantage Säule aufgetragen, welche mit Puffer A gespült und mit Puffer B im Gradienten eluiert wird. Es werden alle zwei Minuten Fraktionen gesammelt. Die Fraktion 40 wurde zur weiteren Bearbeitung unterworfen (Chromatogramm siehe Abb. 2). 25

#### Chromatographiebedingungen:

Säule: Amicon-Vantage (6 cm Durchmesser × 13 cm Füllhöhe) 30  
 Füllmaterial: Merck Fractogel SP-650 (M)  
 Puffer A: 0,1 M Essigsäure, 20% Methanol  
 Puffer B: 0,5 M Essigsäure, 20% Methanol, 1 M Ammoniumacetat  
 Gradient: 0—40% B in 60 min, 40% B auf 100% B in 10 min 35  
 Fluß: 50 ml/min  
 Detektion: 280 nm  
 Chromatographieranlage: BioPilot (Pharmacia)  
 Fraktionen: á 2 min ab Start des Gradienten 40

#### Semipräparative Reverse-Phase C4-Chromatographie

Die Fraktion 40 wurde sukzessive in mehreren identischen Chromatographien über eine semipräparative Reverse-Phase Säule aufgetrennt. Die Fraktion 37 enthielt die erfindungsgemäße Substanz (Chromatogramm siehe Abb. 3). 45

#### Chromatographiebedingungen:

Säule: 2 cm × 12,5 cm Stahlsäule  
 Füllmaterial: Parcosil RP-C4 5 µm, 300 Å  
 Puffer A: 0,1% TFA  
 Puffer B: 0,1% TFA, 80% Acetonitril 50  
 Gradient: 5—50% B in 45 min, 50—100% B in 10 min  
 Fluß: 2 ml/min  
 Detektion: 220 nm  
 Chromatographieranlage: Kontron  
 Fraktionen: á 1 min ab Start des Gradienten 55

#### Analytische Reverse-Phase C18-Chromatographie

Die Fraktion 37 aus dem semipräparativen Trennschritt wurde auf einer analytischen Säule weiter aufgereinigt (Chromatogramm siehe Abb. 4). 60

#### Chromatographiebedingungen:

Säule: 0,46 cm × 25 cm Stahlsäule  
 Füllmaterial: Vydac RP-C18, 5 µm, 300 Å  
 Puffer A: 0,1% TFA  
 Puffer B: 0,1% TFA, 80% Acetonitril 65  
 Gradient: 5—50% B in 45 min, 50—100% B in 10 min  
 Fluß: 0,7 ml/min  
 Detektion: 214 nm

**Chromatographieanlage: Kontron.**

In dieser Rechromatographie wird die Reinheit des isolierten Peptides, wie es zur weiteren Analytik verwendet wird, deutlich (Chromatogramm siehe Abb. 4).

5 **Kapillar-Zonen-Elektrophorese**

Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine Kapillarzonen-Elektrophorese angefertigt. Die Fraktion 34 enthält die zu über 98% aufgereinigte Substanz (Elektropherogramm siehe Abb. 5).

**Bedingungen:**

- 10 Kapillare: fused silica  
 Effektive Länge: 50 cm  
 Gesamtlänge: 57 cm  
 Puffer: 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 2,5, 0,2% Hydroxypropylmethylcellulose  
 Strom: 120 µA const.  
 15 Detektion: 200 nm  
 Temperatur: 25°C

**Beispiel 2**

20 **Massenbestimmung**

- Alle Massenbestimmungen des unmodifizierten Peptids, von proteolytischen Fragmenten und chemisch modifizierten Derivaten wurden auf einem Elektrospray-Massenspektrometer (Sciex API III, Fa. Perkin Elmer) durchgeführt. Die Molekülmasse der unbehandelten Peptids wurde zu 3928,0 ± 0,5 Da (Massenspektrum siehe 25 Abb. 6a) bestimmt.

**Bestimmung von Cysteinen**

- Cysteine lassen sich nach vorheriger chemischer Derivatisierung, zum Beispiel nach Reduktion mit β-Mercaptoethanol und Carboxamidomethylierung mit Iodacetamid, in der Peptid-Sequenzierung nachweisen. Nach der 30 Derivatisierung schließt sich eine Entsalzung vorzugsweise über eine analytische Reverse-Phase Chromatographie mit einer Vydac RP-C18 Säule (4,6 mm × 25 cm) an. Ein Teil des so modifizierten Peptids wird der Sequenzanalyse zugeführt, mit dem anderen Teil ergibt eine Massenbestimmung eine Molekülmasse von 4276,5 ± 0,6 Da (Massenspektrum siehe Abb. 6b). Aus der Massendifferenz von 348,5 ± 0,6 Da zwischen dem 35 alkylierten und dem nativen Peptid wird geschlossen, daß das Peptid sechs Cysteine enthält, welche zudem mit drei Disulfidbrücken untereinander verbunden sind.

**Aminosäureanalyse**

- 40 Nach Gasphasen-Hydrolyse mit 6 N HCl für 1 Stunde bei 160°C werden die Aminosäuren mit einem automatischen Aminosäureanalysator (AminoQuant, Hewlett-Packard) nach Doppelmarkierung mit OPA/Fmoc mit dem Standardprogramm analysiert. Die Ergebnisse einer Aminosäureanalyse des erfindungsgemäßen Peptids sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

45

50

55

60

65

Tabelle 1

## Aminosäurezusammensetzung von hBD-1

Aminosäure	n <sub>ASA</sub>	n <sub>Seq</sub>	Aminosäure	n <sub>ASA</sub>	n <sub>Seq</sub>	
Asx	2.38	2	Tyr	2.53	3	
Glx*	2.06	2	Val	1.03	1	10
Ser	2.38	3	Phe <sup>a</sup>	1.00	1	
His	0.88	1	Ile	2.00	2	
Gly	4.12	4	Leu	1.06	1	15
Thr	1.71	2	Lys	4.26	4	
Ala	2.03	2	Pro	0.97	1	
Arg	1.06	1	Cys <sup>b</sup>	—	6	20

<sup>a</sup>Alle Werte sind auf Phenylalanin bezogen worden. <sup>b</sup>Die Anzahl der Cysteine wurden über MS bestimmt. \*Asparagin und Glutamin wurden als Aspartat und Glutamat bestimmt.

## Sequenzbestimmung

Sowohl das native als auch das carboxyamidomethylierte Peptid werden mittels Edman-Abbau auf einem ABI 473 A Sequenzer unter Verwendung des Standard-Programms analysiert. Die Proben werden auf mit Polybrene vorbehandelte Membranen in Mengen zwischen 100 und 400 pmol aufgetragen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Aminosäureanalyse und den Massenbestimmungen ergibt sich die folgende Sequenz:

DHYNCVSSGG QCLYSACPIF TKIQGTCYRG KAKCCK

## Datenbankvergleich

Ein Datenbankvergleich wurde mit Hilfe des HUSAR-Programmpakets an den SwissProt und EMBL-Nukleinsäure Datenbanken durchgeführt. Es wurde eine Sequenzhomologie zu verschiedenen Mitgliedern der Superfamilie der  $\beta$ -Defensine festgestellt, insbesondere zu dem "Tracheal Antimicrobial Peptide" (kurz TAP) von Rind.

## Beispiel 3

## Synthese von Oligonukleotiden

Drei Primer wurden auf einem Nukleinsäure-Synthesizer (Fa. Applied Biosystems) nach der Phosphoramidit-Methode nach den Angaben des Herstellers synthetisiert, auf OPC-Säulen gereinigt und in bidest. H<sub>2</sub>O gelöst. BD-N und BD-C bilden ein Paar sogenannter "degenerierter" PCR-Primer, welche sämtliche Codierungsmöglichkeiten für die in Beispiel 2 bestimmten amino- und carboxyterminalen Aminosäuresequenzen des  $\beta$ -Defensins und eine zusätzliche Linkersequenz mit Restriktionsschnittstellen für die spätere Klonierung enthalten. Mit Unip-2 wird die Erststrangsynthese der cDNA durchgeführt.

BD-N 5'-CCCGGGAATTCTAGAGAYCAYTAYAAATGYGT-3' 32 Variationen 55  
 BD-C 5'-CCCGGGAATTCTAGATARCANGTNCCTG DATYTT-3' 384 Variationen  
 Unip-2 5'-CCTGAATTCTAGAGCTCATTTTTTTTTTTTTTTT-3'

## Präparation von cDNA

Aus humanem Gewebe wurde mit Hilfe eines automatischen Nukleinsäureextraktors (ABI, 340) Gesamt-RNA nach den Angaben des Herstellers präpariert. Aus 5  $\mu$ g dieser RNA wurde die mRNA unter Verwendung des Primers Unip-2 und von MMLV-RTase (Gibco-BRL) in cDNA-Erststrang umgeschrieben.

## Amplifikation der für hBD-1 codierend n cDNA

Die spezifische Amplifikation der codierenden cDNA wurde durch eine PCR an einem Thermocycler (Perkin-

Elmer-Cetus, 7000) durchgeführt. Mit etwa 1 µg cDNA aus verschiedenen humanen Geweben, insbesondere des Urogenital- und Respirationstraktes, wurden mit den oben aufgeführten Primern nach Standardmethoden die codierenden cDNAs erhalten.

#### Nukleinsäure-Sequenzierung

Die Nukleinsäuresequenz nach routinemäßig ausgeführter Fluoreszenzsequenzierung ergab die unten aufgeführte Struktur. Wo die DNA-Sequenz mit der Proteinsequenz von hBD-1 übereinstimmt, sind die Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Die Konsensussequenz für eine hypothetische Polyadenylierungs-Stelle ist einfach und für das Stop-Codon doppelt unterstrichen.

```

1   D   H   Y   N   C   V   S   S   G   G   Q   C   L   Y   S   15
1   GAC CAC TAT AAC TGC GTC AGC AGT GGA GGG CAA TGT CTC TAT TCT 45
15
16  A   C   P   I   F   T   K   I   Q   G   T   C   Y   R   G   30
46  GCC TGC CCG ATC TTT ACC AAA ATT CAA GGC ACC TGT TAC AGA GGG 90
20
31  K   A   K   C   C   K
91  AAG GCC AAG TGC TGC AAG TGA GCT GGG AGT GAC CAG AAG AAA TGA 135
136 CGC AGA AGT GAA ATG AAC TTT TTA TAA GCA TTC TTT TAA TAA AGG 180
25
181 AAA ATT GCT TTT GAA GTA TAA AAA AAA AAA AAA AAA 216

```

#### Patentansprüche

1.  $\beta$ -Defensin hBD-1 mit nachfolgender Aminosäuresequenz

DHYNCVSSGG QCLYSACPIF TKIQGTCYRG KAKCKK

sowie dessen biologisch aktiven Fragmente und/oder Derivate, insbesondere amidierte, acetylierte, sulfatierte, phosphorylierte und/oder glykosylierte Derivate.

2. Polynukleotid kodierend für  $\beta$ -Defensin hBD-1 nach Anspruch 1 und/oder dessen Fragmente.

3. Polynukleotid nach Anspruch 2 dadurch gekennzeichnet, daß diese ein cDNA-Fragment der nachstehenden Formel ist

```

GAC CAC TAT AAC TGC GTC AGC AGT GGA GGG
CAA TGT CTC TAT TCT GCC TGC CCG ATC TTT
ACC AAA ATT CAA GGC ACC TGT TAC AGA GGG
AAG GCC AAG TGC TGC AAG

```

4. Verfahren zur Herstellung eines  $\beta$ -Defensins hBD-1 gemäß Anspruch 1 durch Extraktion von Hämofiltrat durch Kationenaustausch-Extraktion mit nachfolgender Elution der adsorbierten Substanzen, Ammoniumsulfat-Fällung der im Eluat vorhandenen Peptide und Proteine, Aufnahme des Präzipitats in wäßriger Lösung und Abtrennung der Proteine durch eine Ultrafiltration, eine erneute Kationenaustausch-Chromatographie des die Peptide enthaltenden Ultrafiltrats sowie eine Umkehrphasen-Chromatographie.

5. Verfahren zur Herstellung eines  $\beta$ -Defensins hBD-1 gemäß Anspruch 1 durch Festphasensynthese im Sinne der Merrifield-Synthese mit geschützten Aminosäuren.

6. Verfahren zur Herstellung eines  $\beta$ -Defensins hBD-1 gemäß Anspruch 1 durch routinemäßig bekannte Expression mittels gängiger biotechnologischer Vektoren.

7. Diagnostikum des Stoffes nach Anspruch 1 nach Anspruch 1 enthaltend poly- oder monoklonale Antikörper gegen  $\beta$ -Defensin hBD-1 oder mit der für das  $\beta$ -Defensin kodierenden Nukleinsäure oder mRNA.

8. Diagnostikum enthaltend den Stoff nach Anspruch 1 für Testsysteme zur Kontrolle von Plasma-, Urin- und Liquor cerebrospinalis-Spiegeln dieser Substanz.

9. Diagnostikum enthaltend den Stoff nach Anspruch 1 als Marker für Funktionsstörungen des Immunsystems und von inflammatorischen Prozessen.

10. Arzneimittel enthaltend den Stoff nach Anspruch 1,  $\beta$ -Defensin hBD-1, als wirksamen Bestandteil.

11. Verwendung von  $\beta$ -Defensin hBD-1 gemäß Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Störungen bei entzündlichen Prozessen, gestörter Entzündungsreaktion, insbesondere bei Schädigung der Makrophagenmigration.

12. Verwendung von  $\beta$ -Defensin hBD-1 gemäß Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur

Behandlung von Infektionserkrankungen, indem es als Antibiotikum verwandt wird.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

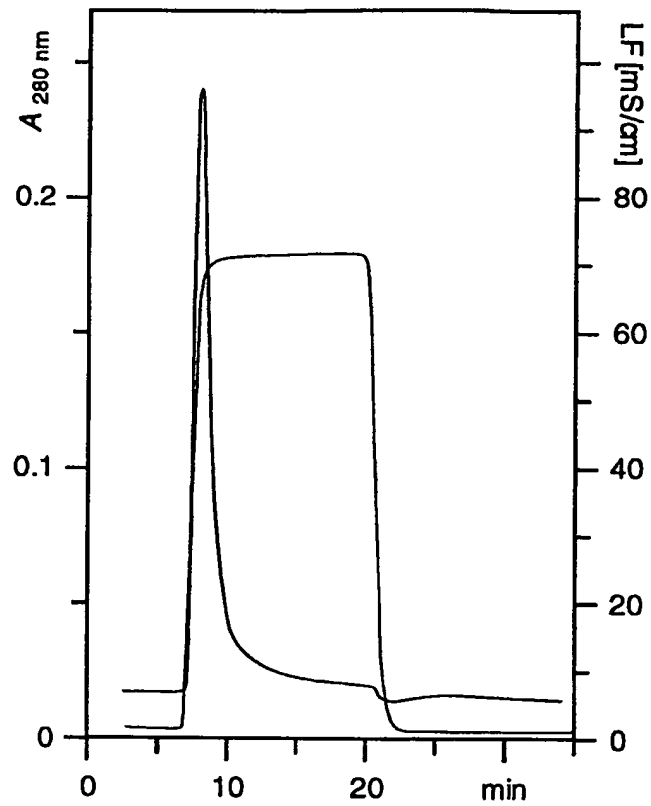
55

60

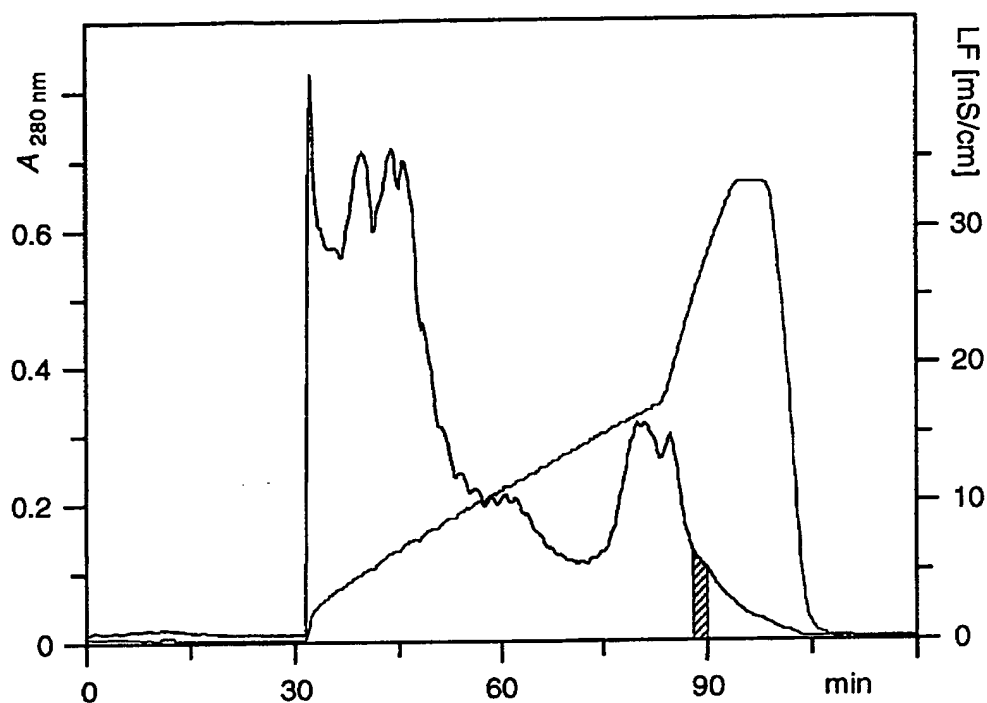
65



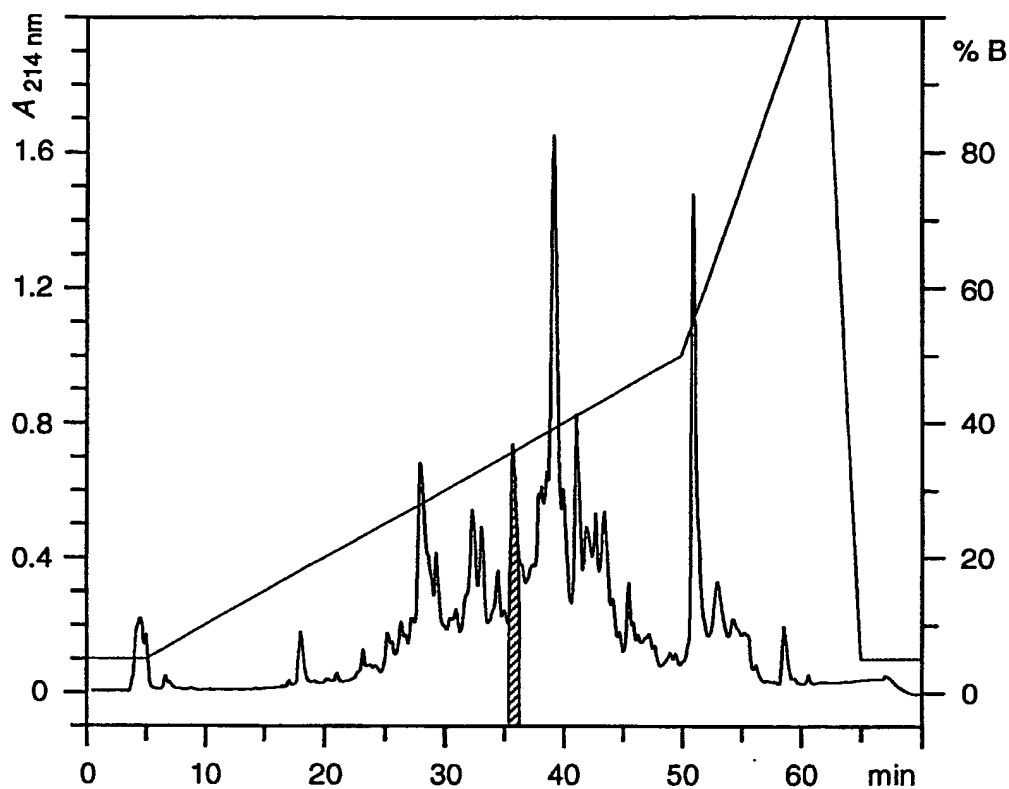
- Le rseite -

**Abb. 1:**

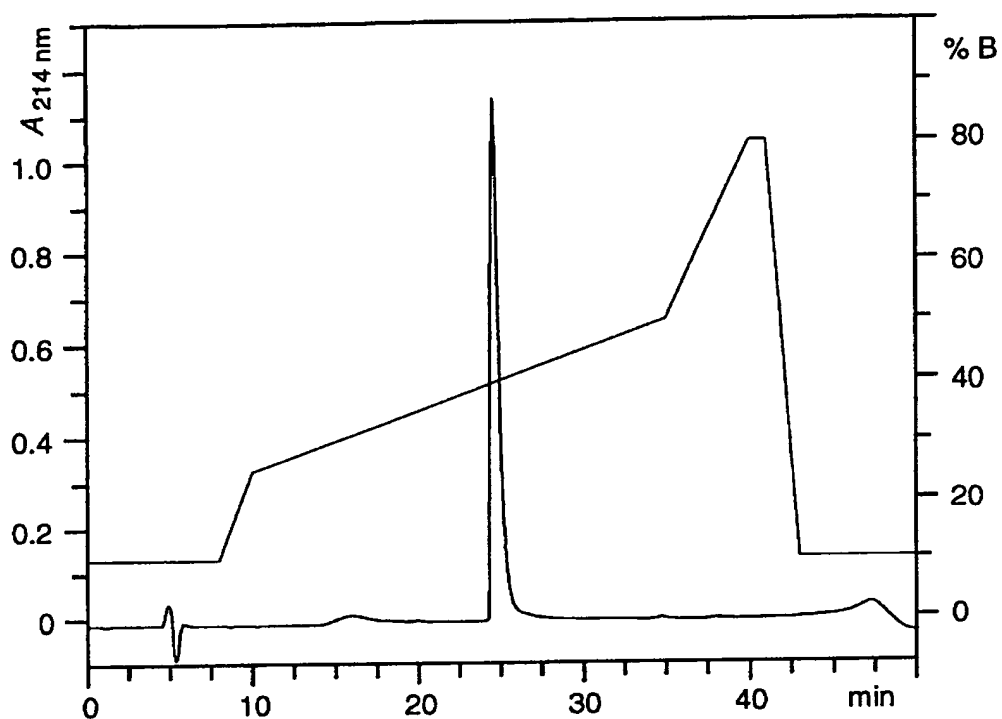
Pilot - Scale Extraktion des Hämofiltrats durch Kationenaustausch - Chromatographie (— Absorption bei 280 nm, — Leitfähigkeit).

**Abb. 2:**

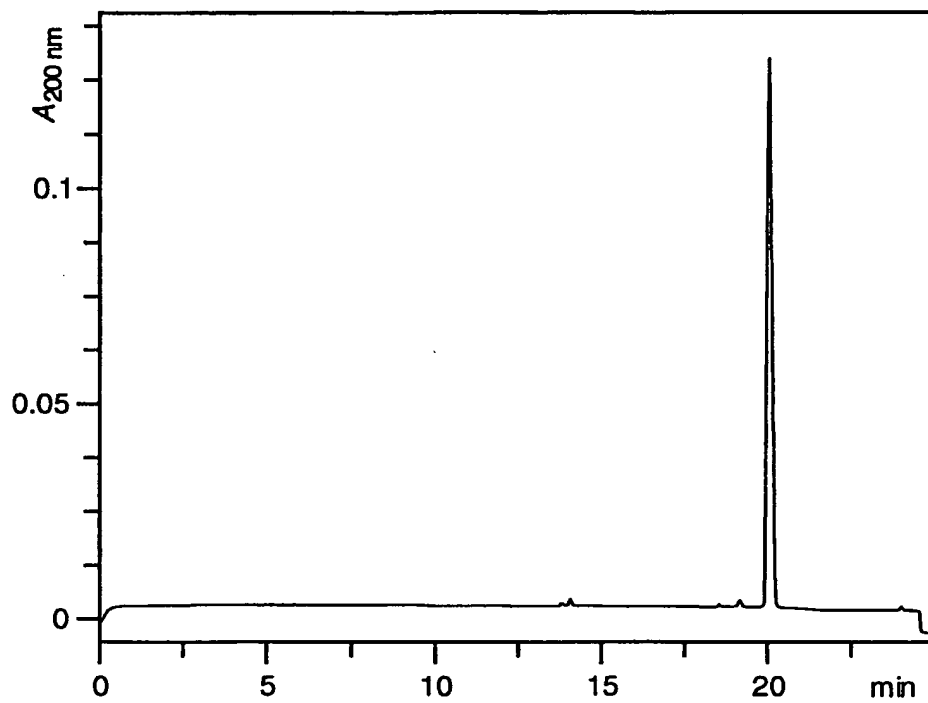
Präparative Kationenaustausch - Chromatographie nach der Ultrafiltration. Die weiter aufgearbeitete Fraktion 40 ist durch Schraffur hervorgehoben (— Absorption bei 280 nm, — Leitfähigkeit).

**Abb. 3:**

Semipräparative Reverse - Phase C4 - Chromatographie der Fraktion 40 aus Abb. 2. Fraktion 36 ist durch Schraffur hervorgehoben (— Absorption bei 214 nm, — Gradient in % B).



**Abb. 4:**  
Analytische Reverse - Phase C18 - Chromatographie der Fraktion 36 aus Abb. 3 (— Absorption bei 214 nm, — Gradient in % B).



**Abb. 5:**  
Elektropherogramm des aufgereinigten Peptids aus Abb. 4.

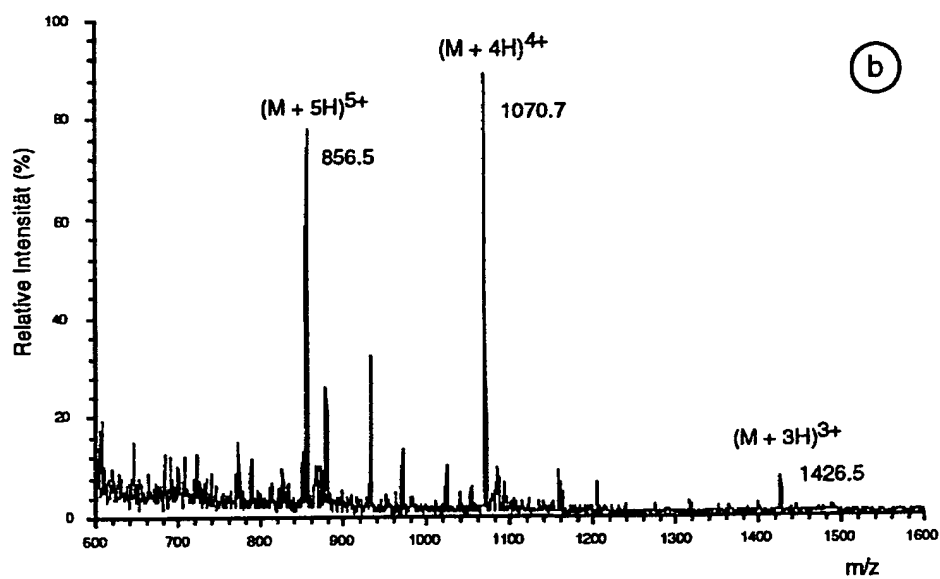
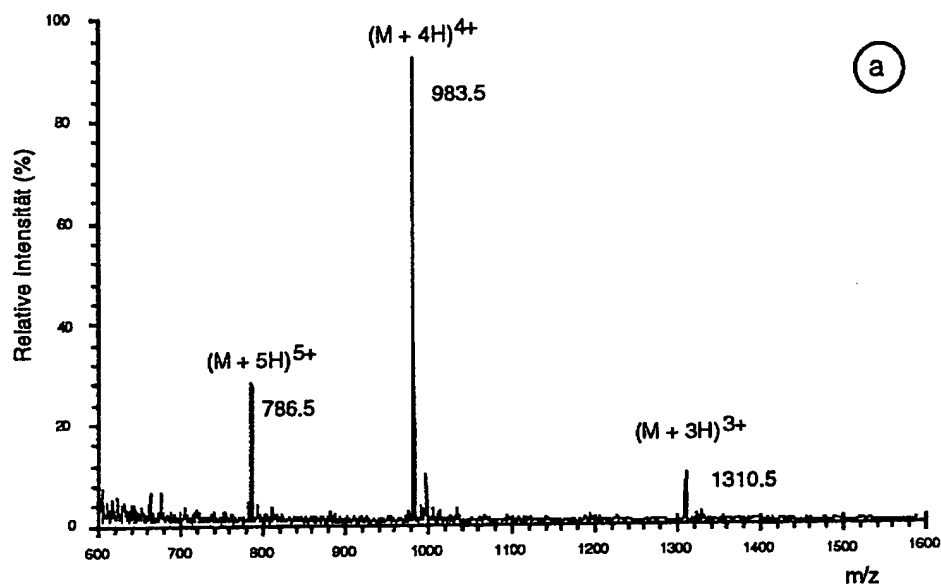


Abb. 6:

a.) Massenspektrum des nativen Peptids, b.) Massenspektrum des alkylierten Peptids

L37 ANSWER 63 OF 568 CA COPYRIGHT 2002 ACS  
AN 124:255247 CA  
TI Human circulating  $\beta$ -defensin hBD-1  
IN Bensch, Klaus W.; Forssmann, Wolf-Georg; Schulz-Knappe, Peter  
PA Germany  
SO Ger. Offen., 13 pp.  
PI DE 4427531 A1 19960208 DE 1994-4427531 19940804  
AB An antibiotic **peptide**, hBD-1, is isolated from human **hemofiltrate** and a cDNA is provided for prodn. of recombinant hBD-1 for diagnosis and treatment of disturbances in inflammatory and immune processes. Thus, hBD-1, with 36 amino acid residues, was purified from human **hemofiltrate** by (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pptn., ultrafiltration, and **chromatog.** and sequenced. Degenerate PCR primers based on this sequence were synthesized and used to amplify hBD-1 cDNA from various human tissues; the cDNA was also sequenced.

L3: Entry 1 of 1

File: DWPI

Feb 8, 1996

DERWENT-ACC-NO: 1996-098186  
DERWENT-WEEK: 199611  
COPYRIGHT 2002 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Human beta-defensin 1 isolated from haemofiltrate - useful for treating and diagnosing infection and inflammation

INVENTOR: BENSCH, K W; FORSSMANN, W ; SCHULZ-KNAPPE, P

PRIORITY-DATA: 1994DE-4427531 (August 4, 1994)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES	MAIN-IPC
<u>DE 4427531 A1</u>	February 8, 1996		013	C07K007/00

INT-CL (IPC): A61 K 38/22; A61 K 49/00; C07 K 7/00

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 4427531A  
BASIC-ABSTRACT:

beta-defensin, hBD-1, of formula (I) and its biologically active fragments and/or derivs. (esp. amidated, acetylated, sulphated, phosphorylated and/or glycosylated) are new: DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQTGTCYR GKAKCKK (I). Also new is nucleic acid (II), pref. the 108 base sequence given in the specification, encoding (I) or its fragments.

USE - hBD-1 is used to treat inflammation (partic. where associated with abnormal macrophage migration) or (as an antibiotic) infection. Antibodies (mono- or poly-clonal) that react with hBD-1 (a marker for functional disorders of the immune system and of inflammatory processes) can be used diagnostically, e.g. to measure levels of hBD-1 in plasma, urine or cerebrospinal fluid. Probes that hybridise with (II) can be used similarly.